

Barbara Poniedziałek*, Piotr Rzymiski*, Mikołaj Kokociński,
Lubomira Burchardt**, Krzysztof Wiktorowicz***

**ZMIANY FLUORESCENCJI CHLOROFILU *CYLINDROSPERMOPSIS
RACIBORSKII* I *APHANIZOMENON FLOS-AQUAE* POD WPŁYWEM
SOLI OŁOWIU**

**CHANGES OF *CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII* AND
APHANIZOMENON FLOS-AQUAE CHLOROPHYLL FLUORESCENCE
UNDER THE INFLUENCE OF LEAD**

Słowa kluczowe: sinice, fluorescencja, metale ciężkie, cytometria przepływowa.

Key words: cyanobacteria, fluorescence, heavy metals, flow cytometry.

*Impact of heavy metals on environment including living organism is still an object of studies. Blue-green algae (Cyanobacteria) are considered as the evolutionally oldest organisms living on Earth and probably had developed several mechanisms of adverse environmental conditions. Latest reports indicate that selected Cyanobacteria species are capable of high heavy metals accumulation. Different tolerance is observed depending on species of Cyanobacteria. Using flow cytometry method we analyzed impact of lead salt ($Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$) in three concentrations 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M on chlorophyll fluorescence of two Cyanobacteria: *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon flos-aquae*. Samples were incubated for 24h. Fluorescence measurement was conducted in 4 time intervals. Time-dependent and concentration-dependent fluorescence inhibition was observed. Higher inhibition concerned *Cylindrospermopsis raciborskii*. Most likely destruction of thylakoids and degradation of chlorophyll occurred in cells of Cyanobacteria. Fluorescence measurement using flow cytometry can be an effective tool in analyzing a heavy metals impact on cells.*

* *Dr Barbara Poniedziałek, mgr Piotr Rzymiski, prof. dr hab. Krzysztof Wiktorowicz – Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań; tel.: 61 853 05 71; e-mail: wnozbiol@ump.edu.pl*

** *Dr Mikołaj Kokociński, prof. dr hab. Lubomira Burchardt – Zakład Hydrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel.: 61 829 57 65; e-mail: hydro@amu.edu.pl*

1. WPROWADZENIE

Sinice (*Cyanobacteria*) to prokariotyczne mikroorganizmy zdolne do fotosyntezy w obecności chlorofilu *a* i fikocyjaniny. Są to organizmy kosmopolityczne, występując w różnych warunkach klimatycznych. Większość z poznanych dotychczas 2,5 tys. gatunków sinic jest związana z różnorodnym środowiskiem wodnym, niektóre gatunki mogą występować również w wodach silnie zanieczyszczonych metalami ciężkimi [Seckbach 2007, Oren, 2011]. Przy odpowiednich poziomach azotu i fosforu oraz temperatury organizmy te mogą tworzyć tzw. zakwity. Pośród kwitnących sinic występują gatunki zdolne do produkcji toksycznych dla człowieka alkaloidów i cyklicznych peptydów o różnorodnym działaniu, głównie hepato-, dermato- lub neurotoksycznym [Apeldoorn i in. 2007]. Do gatunków toksycznych zalicza się m.in. niektóre szczepy *Cylindrospermopsis raciborskii* oraz *Aphanizomenon flos-aquae* [Lagos 1999, Ballot 2010], które wykorzystaliśmy w naszych badaniach.

Sinice uznaje się za jedne z najstarszych ewolucyjnie organizmów. Ich liczące około 3,5 mld lat prekambryjskie szczątki zachowały się w postaci tzw. stromatolitów [Stal 2000]. Jest to prawdopodobna przyczyna przystosowania się niektórych gatunków czy szczepów do ekstremalnych warunków egzystencji, w tym również do skażenia środowiska przyrodniczego. Ewolucyjne mechanizmy adaptacji sinic do różnorodnych pod względem parametrów fizyczno-chemicznych i biologicznych środowisk były powodem podjęcia badań nad tolerancją wybranych gatunków na różne stężenia metali ciężkich.

Metale ciężkie występują naturalnie w skorupie ziemskiej, glebach i wodach gruntowych, jednakże ich emisja ze źródeł antropogenicznych, takich jak rolnictwo czy przemysł, stanowi poważny problem środowiskowy. Ołów (Pb) jest jednym z metali ciężkich występujących powszechnie w środowisku wodnym, wykazującym toksyczne działanie zarówno w stosunku do roślin, zwierząt, jak i w stosunku do człowieka [Ruangsombon i in. 2006, Pinchasov i in. 2006, Chakraborty i in. 2011].

Celem badań prezentowanych w niniejszej pracy była ocena wpływu soli ołowiu na fluorescencję chlorofilu *a* dwóch gatunków sinic (*Cylindrospermopsis raciborskii* oraz *Aphanizomenon flos-aquae*), w zależności od stężenia metalu oraz czasu inkubacji. Ocenę oparto na pomiarach fluorescencji chlorofilu *a* za pomocą cytometrii przepływowej – techniki powszechnie wykorzystywanej w diagnostyce medycznej, aczkolwiek o rosnącym znaczeniu także w innych dziedzinach nauki, m.in. w analizach komórek fitoplanktonu. Metoda ta pozwala na szybkie, automatyczne pomiary takich parametrów jak ziarnistość, wielkość czy fluorescencja komórek obecnych w niewielkich objętościowo próbach. Analiza zmian autofluorescencji chlorofilu *a* jest metodą pozwalającą na oszacowanie dynamiki rozwoju sinic pod wpływem wybranych czynników środowiskowych.

2. MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań były dwa gatunki sinic: *Cylindrospermopsis raciborskii* oraz *Aphanizomenon flos-aquae* (rzęd: *Nostocales*), wyizolowane z próbek środowiskowych pochodzących z jeziora Bityńskiego i należące do stałej kolekcji kultur Zakładu Hydrobiologii Uniwersytetu A. Mickiewicza w Poznaniu.

Hodowle sinic prowadzono w 500 ml zlewkach wypełnionych pożywką (200 ml) BG 11 [Rippka i in. 1979], zakorkowanych korkami wykonanymi z gazy i płótna. Tak przygotowane hodowle umieszczono w komorach termostatycznych, gdzie panowała temperatura 25°C, przy oświetleniu 16-35 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ dostarczonym za pomocą świetlówek OSRAM limilux w cyklu 16:8 (światło/ciemność).

Do hodowli dodawano octanu ołowiu II ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (POCH SA), uzyskując w pożywce stężenia 1 μM , 10 μM i 100 μM . Badania wykonano w 10 powtórzeniach.

Intensywność pomiarów fluorescencji mierzono cytometrem przepływowym FACScan (Becton Dickinson), wyposażonym w 15 mW laser argonowy, emitujący światło o długości 488 nm.

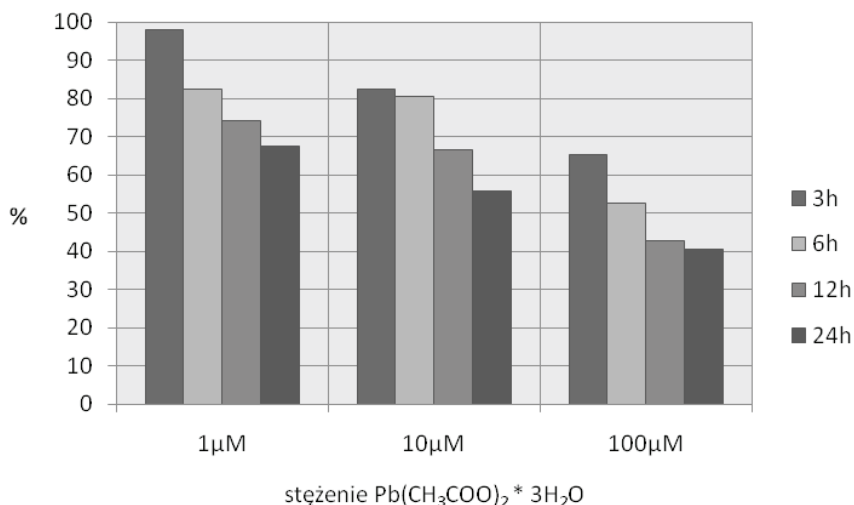
Komórki wybrakowano na podstawie rozproszenia światła lasera, będącego wykładnikiem wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC) komórek.

Fluorescencja chlorofilu *a* była rejestrowana w kanale detekcji fluorescencji FL3 rejestrującym światło o długości >670 nm. Analizy danych dokonano za pomocą programu CellQuest (Becton Dickinson).

3. WYNIKI

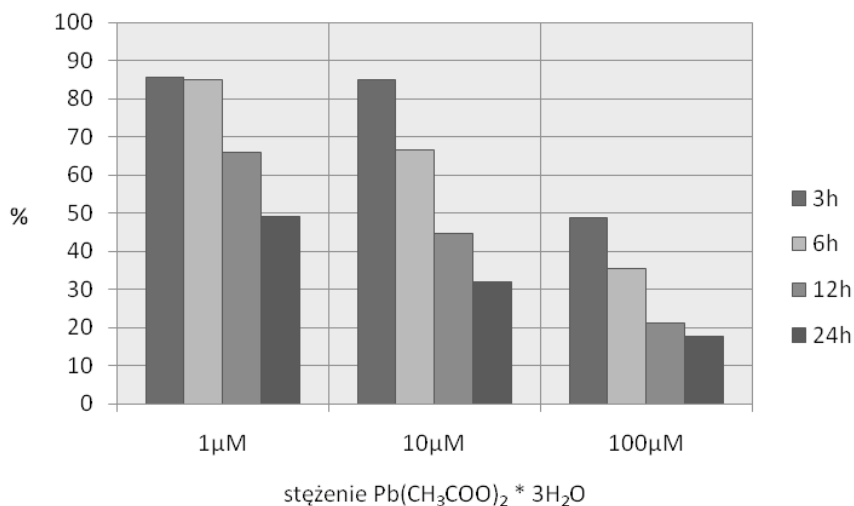
W przypadku obu badanych gatunków sinic zaobserwowano inhibicyjny wpływ soli ołowiu na autofluorescencję chlorofilu *a* (rys. 1 i 2). Najniższe wartości fluorescencji obserwowano po 24 godzinach inkubacji. Różnice zaobserwowano również ze względu na stężenie soli – najsilniejsze hamowanie fluorescencji obserwowano przy najwyższym zastosowanym stężeniu – 100 μM . Oba czynniki – czas i stężenie, wynoszącym oddziaływały na autofluorescencję w sposób liniowy.

Z porównania obu gatunków wynika, że silniejsze hamowanie fluorescencji występowało u *Cylindrospermopsis raciborskii*. Nawet przy najniższym stężeniu badanej soli ołowiu (1 μM) i najkrótszym czasie inkubacji (3-godz.) zaobserwowano ponad 15% spadek fluorescencji względem kontroli, podczas gdy dla *Aphanizomenon flos-aquae* spadek ten wynosił jedynie 2%. Porównanie zmian fluorescencji przy najwyższym badanym stężeniu (100 μM) po upływie 24 godzin inkubacji wskazało na ponad 80-procentowe wygaszenie fluorescencji dla *Cylindrospermopsis raciborskii*, dla *Aphanizomenon flos-aquae* natomiast wygaszenie było rzędu 60%.



Rys. 1. Procentowe (%) zmiany fluorescencji *Aphanizomenon flos-aquae* w stosunku do kontroli w zależności od stężenia $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (μM) i czasu inkubacji

Fig. 1. Concentration and time dependent percentage (%) fluorescence changes of *Aphanizomenon flos-aquae* fluorescence compared to control depending on $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ concentration (μM) and incubation time



Rys. 2. Procentowe (%) zmiany fluorescencji *Cyndrospermopsis raciborskii* w stosunku do kontroli w zależności od stężenia $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (μM) i czasu inkubacji

Fig. 2. Concentration and time dependent percentage (%) fluorescence changes of *Cyndrospermopsis raciborskii* fluorescence compared to control depending on $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ concentration (μM) and incubation time

4. Dyskusja wyników

Toksyczny wpływ ołowiu na organizmy żywe stwierdzono już ponad 2 tysiące lat temu [Lewis 1985]. Powszechnie znany jest również fakt jego bioakumulacji, zwłaszcza w środowisku wodnym, oraz biomagnifikacji w łańcuchach troficznych – od komórek fitoplanktonu aż do człowieka, który korzysta z zasobów wodnych jako źródła pokarmu [Vymazal 1990, Carpentier 2001]. Dokładny proces toksycznego wpływu ołowiu na poszczególne struktury organizmów, w tym pojedyncze komórki, jest wciąż obiektem badań [Pawlik-Skowrońska, Skowroński 1996].

W niniejszej pracy wykazano za pomocą cytometrii przepływowej hamowanie fluorescencji chlorofilu *a* dwóch gatunków sinic pod wpływem soli ołowiu. Metoda ta, stosowana powszechnie w naukach medycznych, znajduje coraz szersze zastosowanie w innych dziedzinach nauki. Jej niewątpliwą zaletą jest szybki i zautomatyzowany pomiar, jak również niewielka objętość badanych prób – wystarczającą ilością do wielokrotnej analizy jest objętość 1 ml.

Sinice są interesującym obiektem badawczym, ze względu na wykształcenie wielu przystosowań do egzystencji w środowisku wodnym, niekiedy o skrajnym charakterze [Seckbach 2007]. Istnieją doniesienia o występowaniu sinic w wodach skażonych metalami ciężkimi. Odnotowano przypadki zakwitów sinic w takich środowiskach, czyli masowego namnażania się komórek określonych gatunków przez okres kilkunastu dni, w tym również z udziałem analizowanego gatunku *Aphanizomenon flos-aquae* [Burchardt i in. 2007].

Fluorescencja chlorofilu *a* odzwierciedla aktywność fotosyntetyczną aparatu asymilacyjnego. Intensywność fluorescencji zależy od ilości cząsteczek chlorofilu znajdujących się w danym momencie w stanie wzbudzenia. Im więcej wzbudzonych cząstek chlorofilu, tym intensywniejsza fluorescencja [Garstka 2007]. Obserwowane w naszych badaniach jej wygaszanie jest prawdopodobnie skutkiem uszkodzeń plastydów i degradacją chlorofilu. Podobny efekt zaobserwował Pinchasov [Pinchasov i in. 2006], wykazując spadek stężenia chlorofilu w komórkach sinicy *Synechococcus leopoliensis* w wyniku jej inkubacji z solami ołowiu.

Należy nadmienić, że wśród sinic obserwuje się zróżnicowanie gatunkowe w tolerancji na obecność metali ciężkich w środowisku. Sikora [Sikora i in. 2009] wykazał wzmocnienie fluorescencji pod wpływem soli ołowiu dla *Synechocystis aqualitis*, z kolei Rzymiski [Rzymiski i in. 2011] poczynił podobne obserwacje dla *Microcystis aeruginosa* dla niskich stężeń kadmu i rtęci. W naszych badaniach obserwowano inhibitoryjny wpływ soli ołowiu na oba badane gatunki, jednak silniejszy wpływ stwierdzono dla *Cylindrospermopsis raciborskii*.

5. Podsumowanie

Zaobserwowany w pracy hamujący wpływ soli ołowiu na fluorescencję chlorofilu *a* wzrastał liniowo wraz ze stężeniem soli i czasem inkubacji. Odnotowano różnice w reakcji

na inkubację z $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pomiędzy badanymi gatunkami sinic. Inhibicja fluorescencji chlorofilu *a* była najprawdopodobniej spowodowana destrukcją tylakoidów i degradacją chlorofilu.

Badanie fluorescencji przy pomocy cytometru przepływowego wydaje się być obiecującą techniką w analizie zmian zachodzących w komórkach fitoplanktonu pod wpływem metali ciężkich.

PIŚMIENNICTWO

- APELDOORN M.E., EGMOND H.P., SPEIJERS G.A., BAKKER G.I. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr. Food Res.* (51): 7–60.
- BALLOT A., FASTNER J., WIEDNER C. 2010. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* (4): 1173–1180.
- BURCHARDT L., MARSHALL H.G., KOKOCIŃSKI M., OWSIANNY P.M. 2007. Blooms of *Aphanizomenon flos-aquae* associated with historical trophic changes occurring in Lake Świątokrzyskie, Poland. *Ocean. Hydrobiol. Studies* (36, Suppl. 1): 261–266.
- CARPENTIER R. 2001. The negative action of toxic divalent cations on the photosynthetic apparatus. W: *Handbook of plant and crop stress*. Marcel Dekker, New York.
- CHAKRABORTY N., BANERJEE A., PAL R. 2011. Accumulation of lead by free and immobilized cyanobacteria with special reference to accumulation factor and recovery. *Bio-resour. Technol* 102(5): 4191–4195.
- GARSTKA M. 2007. Strukturalne podstawy reakcji świetlnych fotosyntezy. *Postępy Biol. Kom.* 34(3): 445–476.
- LAGOS N., ONODERA H., ZAGATTO P.A., ANDRINOLO D., AZEVEDO S.M., OSHIMA Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* (37): 1259–1373.
- LEWIS J. 1985. Lead poisoning: A historical perspective. *EPA J.* (11): 15–18.
- OREN A. 2011. Cyanobacterial systematic and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (61): 10–15.
- PAWLIK-SKWOROŃSKA B., SKOWROŃSKI T. 1996. Sinice i ich interakcje z metalami ciężkimi. *Wiadom. Bot.* 40(3–4): 17–30.
- PINCHASOV Y., BERNER T., DUBINSKY Z. 2006. The effect of lead on photosynthesis, as determined by photoacoustics in *Synechococcus leopoliensis* (Cyanobacteria). *Water, Air, Soil Pollut.* 175(1–4): 117–125.
- RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J., HERDMAN M., STANIER R. 1979. Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* (111): 1–61.

- RUANGSOMBOON S., CHIDTHAISONG A., BUNNAG B., INTHORN D., HARVEY N.W. 2006. Lead (Pb²⁺) Removal from Wastewater by the Cyanobacterium *Calothrix marichica*. Kasetsart J. Nat. Sci. (40): 784–794.
- RZYMSKI P., PONIEDZIAŁEK B., KARCZEWSKI J., KOKOCIŃSKI M., BURCHARDT L., WIKTOROWICZ K. 2011. Evaluation of cadmium and mercury impact on cyanobacteria fluorescence emission using flow cytometry – preliminary studies. J. Environ. Sci. Eng. 9(5); w druku.
- SECKBACH J. 2007. Algae and cyanobacteria in extreme environments. Springer, Dordrecht.
- SIKORA J., ŻURAWSKI K., RUTKOWSKA J., PONIEDZIAŁEK B., WIKTOROWICZ K., DUDKOWIAK A. 2009. Wpływ metali ciężkich na fluorescencję chlorofilu *Synechocystis aquatilis*. Ochr. Środ. Zas. Nat. (41): 293–301.
- STAL L.J. 2000. Cyanobacterial mats and stromatolites. W: The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer AP, Dordrecht.
- VYMAZAL J. 1990. Toxicity and accumulation of lead with respect to algae and Cyanobacteria: a review. Acta Hydroch. Hydrob. (18): 513–533.